

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）

公衆浴場におけるレジオネラ症対策に資する検査・消毒方法等の衛生管理手法の開発のための研究

研究代表者 前川 純子 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

#### 分担研究報告書

入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引きの作成

#### 研究分担者

金谷 潤一 富山県衛生研究所 中西 典子 神戸市健康科学研究所  
佐々木 麻里 大分県衛生環境研究センター

#### 研究協力者

大森 恵梨子 仙台市衛生研究所 武藤 千恵子 東京都健康安全研究センター  
長岡 宏美 静岡県環境衛生科学研究所 高橋 直人 静岡市環境保健研究所  
○磯部 順子 富山県衛生研究所 枝川 亜希子 地方独立行政法人  
大阪健康安全基盤研究所  
浅野由紀子 愛媛県立衛生環境研究所

#### 研究要旨

本研究では、入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的として、自施設で内部精度管理を実施するための手引きを作成した。研究班の構成メンバーに対し、手順書に従った内部精度管理の試行を依頼したところ、計 10 機関で内部精度管理が実施された。

非選択培地で求めた添加菌数に対して、非選択培地における回収率は、10.8~151.6%、平均 64.8%、中央値 71.0%であった。これに対し、選択分離培地での回収率は、1.3~78.0%、平均 35.7%、中央値 31.9%と、非選択分離培地に比べ、低かった。選択分離培地における発育菌数は添加菌数と比較すると非選択分離培地のおよそ 7 割で、培地の種類（メーカー）による大きな差は認められなかった。

本研究での検討結果から、回収率の良好範囲を設定するのは困難であると思われたが、自施設で安定した回収率が継続できるよう、内部精度管理を遂行することが大事であると思われた。内部精度管理手順書を基に標準作業書を作成、実施することで、正しく検査されるようになれば、それに基づく衛生指導も適確になり、公衆浴場が適正に管理されるものと思われる。

## A 研究目的

環境水中のレジオネラ属菌を計測する方法として、令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知の別添「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」が示された<sup>1)</sup>。その中に、検査には「信頼性確保のため、精度管理を実施することが求められている」と記載されている。また、内部精度管理の一例として回収率の確認方法について示されている。

そこで、本研究では、入浴施設的环境水におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的として、自施設でレジオネラ属菌検査の内部精度管理を実施するための手引きを作成した。レジオネラ属菌を添加した精度管理用試料水（以下、試料水）について、レジオネラ属菌検査（培養定量）を自施設の検査標準作業書に従って行い、検査結果と添加菌数から回収率を算出して評価する内容とした。この手引きを参考にして、自施設で内部精度管理標準作業書等を作成し、精度管理を遂行することが肝要である。

## B 方法

公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法（薬生衛発0919第1号 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知）を参照し、浴用水やシャワー水などの環境水試料を濃縮し、レジオネラ属菌を検出する手順のための手引きを検討した。

### 1 手引きの概要

培養したレジオネラ属菌を接種し、試料水を作製し、自施設の検査法に従い、検査を実施するという内容とした。

始めに、レジオネラ属菌を30℃3日間培養し、それを滅菌生理食塩水に懸濁し、接種菌液とする。これを希釈して、滅菌生理食塩水に接種し、試料水とする。同時に接種菌数を測定する（A）。

その後、自施設の標準作業書に従い、濃縮検体のレジオネラ属菌数を測定する（B）。

B/Aの値に濃縮率を勘案し、最終的な回収率とする。

また、作業手順に従いフローチャートを作成した。

### 2 手引き書による内部精度管理の試行

研究班の構成メンバーに対し、手引きに従った内部精度管理の試行を依頼したところ、計10機関で内部精度管理が実施された。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究機関内外の倫理委員会等における承認手続きが必要となる研究には該当しない。

## C 結果

### 1 手引きの作成

内部精度管理手引き（別添資料1）とその検査手順フローチャート（別添資料2）を作成した。

### 2 回収率

解析には、同じ施設で複数回実施したデータも同様に加えた。一部の機関では、選択分離培地、非選択分離培地どちらか一方でのみ菌数を測定した。

非選択培地で求めた添加菌数に対して、非選択分離培地における回収率は、10.8～151.6%、平均64.8%、中央値71.0%であった。これに対し、選択分離培地での回収率は、1.3～78.0%、平均35.7%、中央値31.9%と、非選択分離培地に比べ低かった（図1）。一方、選択分離培地について、同じ培地で算出した添加菌数に対する回収率は、3.1～97.0%、平均52.3%、中央値57.9%であった（図2）。1機関で、BCYE $\alpha$ 寒天培地での回収率が100%であったのに対し、GVPC寒天培地での回収率は1.3%と低かった。

### 3 接種菌数と回収率

添加菌数と回収率の関係について、同一試料水を選択分離培地、非選択分離培地の両方を用いて同時に測定した場合の回収率を添加菌数別に比較した（図3）。選択分離培地における発育菌数は添加菌数で比較すると非選択分離培地のおよそ7割で、培地の種類（メーカー）による大きな差は認められなかった。近似曲線により添加菌数から得られる濃縮後の菌数を計算すると、菌数が多くなるにつれ、回収率が高くなる傾向で

あった。

#### 4 使用菌株

10 機関で内部精度管理に使用した菌は、ATCC33152 (*Legionella pneumophila* Sero group1: Lp1)、NIID0058 (感染研保有株 Lp1)、外部精度管理配布株 (Lp9)、自施設分離株 (Lp3) であった。1 機関では、外部精度管理株を使用した場合の回収率 (24.9%、37.2%) と自施設で分離、保管していた株の回収率 (87.8%) に大きな差異が認められた。しかしながら、同様に外部精度管理株を使用した他の機関では、65.6~151.6%の回収率となっていることから、外部精度管理株を使用することに課題があるか否かは明らかではない。「回収率」で触れたように、BCYE  $\alpha$  寒天培地での回収率が 100%であったのに対し、GVPC 寒天培地での回収率が 1.3%と低かった例では、聞き取りしたところ、添加したレジオネラ属菌は、自施設分離株で、濃縮前から選択分離培地での発育が良くない事実が認められた。

#### D 考察

全国におけるレジオネラ症の原因のおよそ 4 割は公衆浴場に関連すると報告されている。従って、患者が報告された場合の感染源調査はもとより、公衆浴場に関連する衛生管理状況の把握のためにも、とりわけ環境水のレジオネラ属菌検査は必要である。浴用水については明確な管理基準が示されており、令和元年に厚労省から標準的検査法が示された。検査機関では、それらの検査法を基に正確な結果を示すことが重要である。そのためには、内部精度管理と外部精度管理の両方で、検査精度を担保していくことが必要となる。

本研究では、自施設で内部精度管理を実施するための手順について検討した。10 機関で実際にこの手順のための手引きに従って内部精度管理を実施したところ、手順について概ね理解が得られた。ただし、レジオネラ属菌の回収率には大きな差が認められ、これらの結果から回収率の良好範囲を示すことは困難であると判断した。その理由の一つは、回収率の低い原因が明らかにならなかったことにある。使用した菌株、培地など比較したが、その原因は特定できなかった。回収率

は、非選択分離培地と選択分離培地では明らかに非選択培地が高かった。しかし、これは選択分離培地の抑制力のためであり、添加菌数も同じ選択分離培地を使うと同等の回収率が得られる。ただし、1 機関で選択分離培地での菌の発育が大きく抑制されたこともあり、このような結果を回避し、確実に技術の検証を行うために、非選択分離培地で回収率を求める必要があると思われた。しかしながら、選択分離培地での抑制力を把握しておくことは重要であることから、できる限り選択分離培地を併用するべきである。いずれの場合でも、自施設において安定した回収率を維持することがもっとも重要である。そのためには、精度管理を実施する前に、培地における使用菌株の発育状況を確認することや、コンラージ棒での塗抹により安定した菌数が得られるなど、基本操作の習得が必要であろう。

本手順書では添加菌数を MacFaland2.0 の濁度の菌液から  $10^3$  CFU/100 $\mu$ l の添加菌液を作製した。添加菌数が多いほど回収率が高い傾向であったが、1 平板に 200 前後のコロニーが発育している場合が数えやすく、添加菌の作製方法 (希釈率など) 工夫が必要かもしれない。平板上の発育菌数が多くなりすぎるのを避けるために添加菌を希釈して塗抹、計測した機関もあったが、希釈の操作により誤差が生じる可能性があることは否定できない。1 機関では希釈して塗抹した場合、希釈しないで塗抹した濃縮水のおよそ 1.25 倍の菌数となった。希釈による誤差であるのか、菌数が多い場合に発育が抑制されるのか、原因は不明である。逆に、回収率が低い機関では、添加菌を少なくすると濃縮後に菌の発育を確認できなくなる可能性が考えられるので、添加菌数はそれぞれの機関で設定する必要がある。

実際の環境水にはレジオネラ属菌だけでなく、夾雑菌に加え、複数の菌種や血清型のレジオネラ属菌が含まれていることがほとんどである。そのため、レジオネラ属菌は選択分離培地より検出される場合が多い。内部精度管理手順で安定した結果が得られるになれば、夾雑菌を混合接種するなどして、より実際の検体に近い検水で精度管理を行うことも必要かもしれない。

## E 結 論

本研究で示した内部精度管理手順書を基本として、自施設にあった標準作業書を作成し、内部精度管理を遂行することにより、検査精度を担保することが望ましい。回収率の良好範囲を設定するのは困難であると思われた。自施設で安定した回収率が継続できるよう、内部精度管理を遂行することが大事である。正しく検査されるようになれば、それに基づく衛生指導も適確になり、公衆浴場が適正に管理されるものと思われる。

## F 研究発表

なし

## G 知的財産権の出願・登録状況

なし

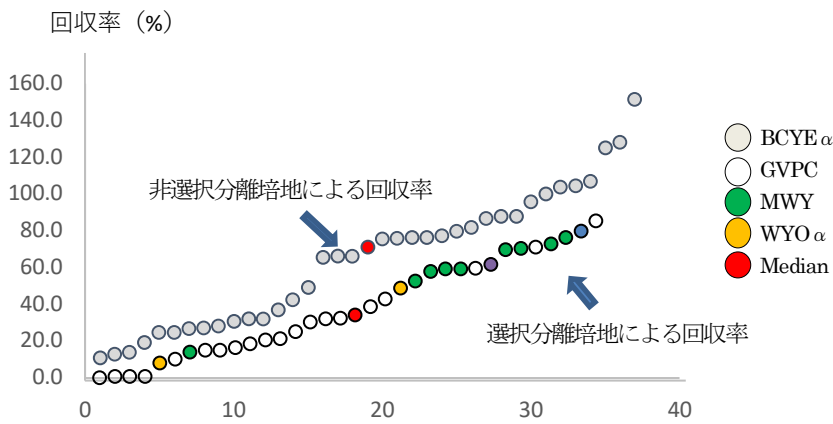


図1. レジオネラ属菌添加試料水の濃縮後の回収率  
(非選択分離培地で求めた添加菌数に対する回収率)

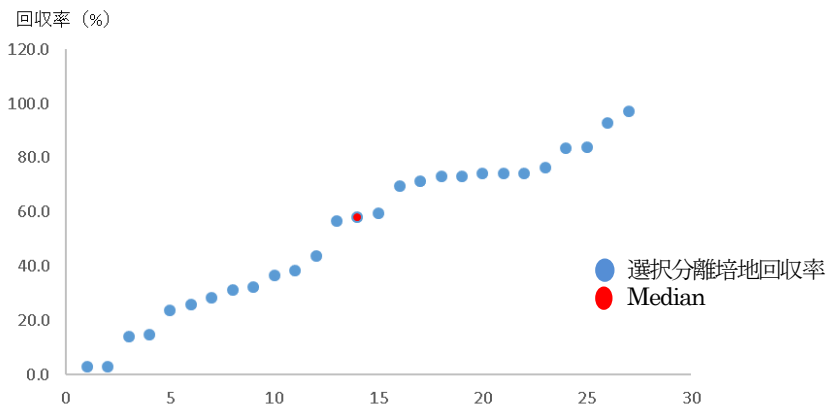


図2. レジオネラ属菌添加試料水の濃縮後の回収率  
(選択分離培地で求めた添加菌数に対する選択分離培地での回収率)

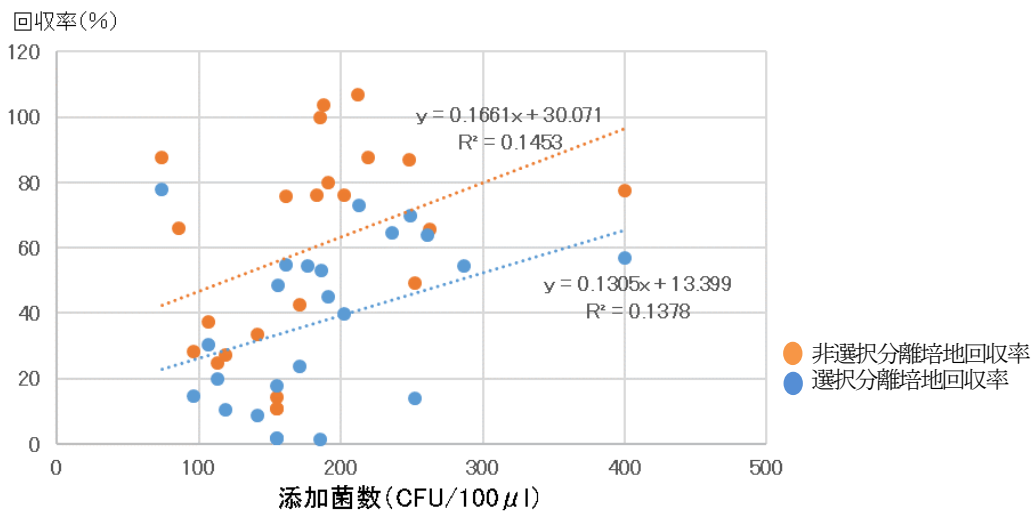


図3. 選択分離培地、非選択分離培地同時測定による添加菌数別回収率の比較

## 入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の内部精度管理のための手引き

環境水中のレジオネラ属菌を計測する方法として、令和元年9月19日薬生衛発0919第1号厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生課長通知の別添「公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について」が示された。その中に、検査には「信頼性確保のため、精度管理を実施することが求められている」と記載されている。また、内部精度管理の一例として回収率の確認方法について示されている。この手引きではその確認方法を具体的に示した。この手引きを参考に、自施設で内部精度管理標準作業書等を作成し、精度管理を遂行することが望ましい。

### 1. 目的

入浴施設の環境水におけるレジオネラ属菌検査の信頼性を担保するため、検査精度を確認し、検査担当者の技術水準を維持、向上させることを目的とする。

### 2. 概要

レジオネラ属菌を添加した内部精度管理用試料水（以下、試料水）について、レジオネラ属菌検査（培養定量）を自施設の検査標準作業書に従って行い、検査結果と添加菌数から回収率を算出して評価する。合わせて、検査手技の安定性を確認する。

### 3. 内部精度管理手順

#### (1) 準備する試薬・器具等

自施設のレジオネラ属菌の検査標準作業手順に必要な器具、試薬、培地に加え、次に示す内部精度管理のために必要な品目を準備する。

① 滅菌した蒸留水、生理食塩水、PBS など 1000 mL。

② レジオネラ属菌

例えば、*Legionella pneumophila* Serogroup 1

(Serogroup 1 である必要はないが、BCYE  $\alpha$  寒天培地に十分に発育する *L. pneumophila* を使用すること)

#### (2) 添加菌液および試料水の調製

培養したレジオネラ属菌を接種し、試料水を作製する。

##### ① 添加菌液の調製

レジオネラ属菌を BCYE  $\alpha$  寒天培地に画線し、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$  で 3 日間培養する<sup>注1</sup>。この発育菌を滅菌生理食塩水に懸濁し、MacFaland 2.0 もしくは吸光度 0.320 程度（波長 625nm）に調整する（レジオネラ属菌数はおよそ  $10^9$  CFU/mL：添加菌原液）。これを滅菌生理食塩水にて  $10^5$  倍希釈し（ $10^4$  CFU/mL：添加菌希釈液）、よく混和したのち、2 mL を 9 mL の滅菌生理食塩水に接種しよく混和する（添加菌液）。

注1 添加するレジオネラ属菌は  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  で 3 日間培養して使用するのが基本であるが、BCYE  $\alpha$  寒天培地上のコロニーの大きさなどにより、発育不十分と判断した場合は再度 BCYE  $\alpha$  寒天培地に画線し、

30±1°Cで3日間培養した菌を使用する。

## ② 添加菌数の測定

この添加菌液から1 mLを分取し、その100 µLをBCYE α 寒天培地<sup>注2</sup>（2枚以上）に接種後、直ちにコンラージ棒を用いてソフトタッチで均等に広げ、試料が吸収されるまで静置する。その培地を36±1°C4～7日間培養後<sup>\*注3</sup>、菌数を数える。この菌数を添加菌数(A)<sup>注4,5</sup>として回収率の算出に用いる。

注2 同様の操作を自施設で使用している選択分離培地でも実施し、使用培地の選択性について把握することが望ましい。

注3 菌数、コロニーの大きさなどにより、7日間培養すると菌数測定が困難になる場合があることから、自施設の培地でのコロニーの発育状況を観察し、培養3日目以降毎日菌数を測定することが望ましい。

注4 回収率を計算する場合の基本となる「添加菌液」の菌数について、自施設内で一定の範囲内に収まることがポイントとなる。この菌数が平板によってばらつく時は、コンラージによる試料の塗抹技術の検証が必要となる。一定の範囲に収まるようになるまで、塗抹する平板数を増やしてCVやZスコアなどで管理状況を判断する。

注5 添加菌の菌数は培養平板上に200 CFU前後となるように菌液を調整することが望ましい。菌懸濁液の濁度は、目視で標準液の濁度に合わせる場合だけでなく、濁度計で調整してもその菌数にはある程度の多少が生じる。必要に応じ、自施設で菌懸濁液の濁度を調整（設定）する。

## ③ 試料水の調製

滅菌した採水容器に滅菌生理食塩水等を990 mL採取し、①の添加菌液10 mLを接種後、よく混和して試料水（レジオネラ属菌はおおよそ $2 \times 10^3$  CFU/100 mL）とする。

## (3) レジオネラ属菌検査

3(2)③で作製した試料水を用いて、レジオネラ属菌検査を行う。検査方法は、自施設の検査標準作業書に従い、レジオネラ属菌数を測定する(B)。検査標準作業書の中で、選択培地のみ使用する場合は、BCYE α 寒天培地を用いたレジオネラ属菌数を測定することで選択培地によるレジオネラ属菌の発育抑制を除外した手技の確認ができる<sup>注6</sup>。

注6 BCYE α 寒天培地を併用した場合、選択分離培地に比べ高い回収率となることが推測されるが、本手順では夾雑菌のない検体を用いていることから、実際の水検体におけるレジオネラ属菌の検出率と関連しない。

## 4. 評価方法

### (1) レジオネラ属菌定量検査 回収率の確認

レジオネラ属菌を添加した試料水について、検査標準作業書に基づく検査を実施し、回収率を算出する<sup>注7</sup>。

自施設の検査標準作業書において100倍濃縮する場合の計算式

$$\text{回収率 (\%)} = B/A \times 100$$

注7 ここで求められる回収率は施設内で安定的であることが望ましい。複数でレジオネラ検査を担当する場合、担当者間においても安定した回収率となることが肝要である。

## (2) 手技の安定性の確認

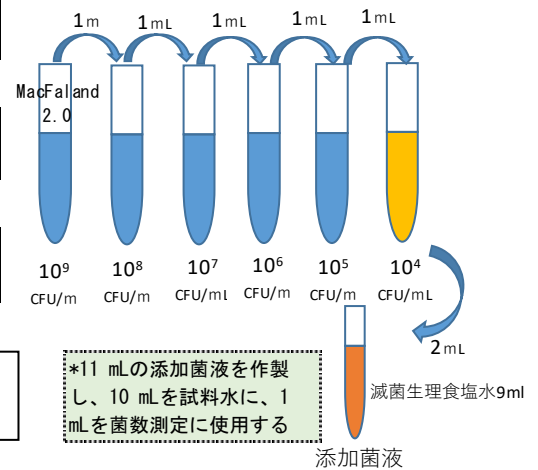
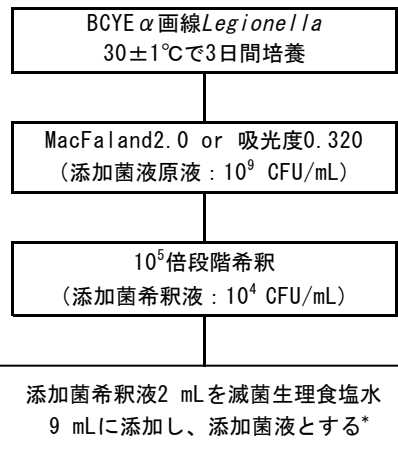
添加菌数 (A)、菌数 (B) の平均値、標準偏差及びzスコアなどにより平板培養時の手技のばらつき度合を確認する。



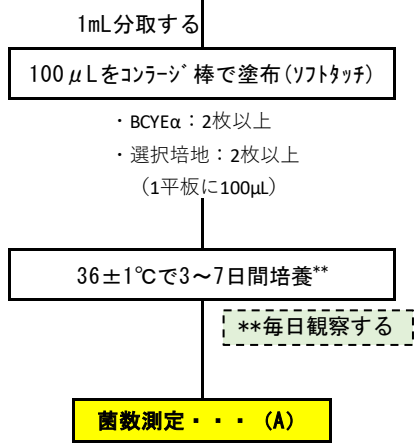
# レジオネラ検査 内部精度管理手順 フローチャート

別添資料 2

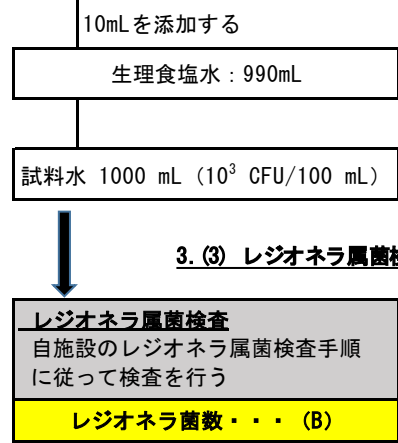
### 3. (2)①添加菌液の調整



### 3. (2)②添加菌数の測定



### 3. (2)③試料水の調整



回収率 (%) \*\*\* = (B) / (A) × 100

\*\*\*試料水を100倍濃縮した場合